[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61N 1/32

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96194608.3

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1150950C

[22] 申请日 1996.5.22 [21] 申请号 96194608.3

[30] 优先权

[32] 1995. 6. 6 [33] US [31] 08/467,566

[32] 1995. 9.29 [33] US [31] 08/537,265

[86] 国际申请 PCT/US1996/007470 1996.5.22

[87] 国际公布 WO1996/039226 英 1996.12.12

[85] 进入国家阶段日期 1997.12.8

[71] 专利权人 基因特伦尼克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 S·B·德夫 冈特·A·霍夫曼
理查德·A·吉尔伯特 早川靖彦
理查德·和勒
马克·J·雅罗哲斯基

审查员 朱世菡

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司

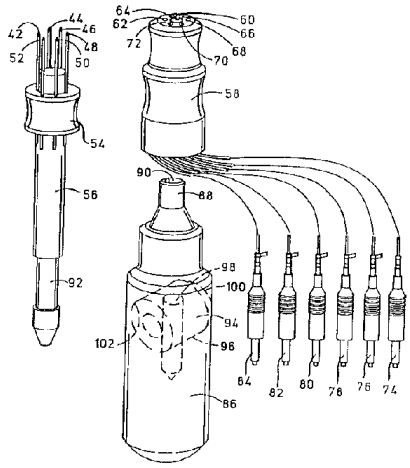
代理人 余 刚

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 16 页

[54] 发明名称 利用电打孔给药和传送基因的治疗设备

[57] 摘要

本发明提出一种利用针阵列设备的体内电疗方法，即电打孔给药疗法。该方法利用本发明的设备将电打孔与化疗药物结合治疗肿瘤，使体内的肿瘤退化。



ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1. 一种用于给活体的选定部分施加电场的设备，该设备包括支撑装置（54），多个电极的电极阵列，该阵列安装在所述支撑装置上，其中至少所述电极之中的一个以上具有适合刺入组织给体内组织细胞电打孔的针形结构，以及电脉冲发生器，该发生器将电信号施加给所述的电极，以便对所述电极之间细胞电打孔，其特征在于：

所述的电极阵列具有多个对置电极对，彼此间隔地安装在所述的支撑上，所述的电极对之中的至少一个以上具有针形结构，并在所述的支撑装置上彼此间隔地定位，以便从选定的活体内的组织的相对侧面刺入选定的组织来对该组织的细胞电打孔；以及

电脉冲发生器，其具有开关装置用于选择性地将大振幅脉冲电信号施加给所述电极的对置电极对，其中所述的电信号与所述的对置电极对之间的距离成比例，从而给所述的电极之间的组织细胞电打孔。

2. 根据权利要求 1 所述的设备，其中所述的选定的电极对（50，52）定义矩形的角。

3. 根据权利要求 2 所述的设备，其中所述电极阵列包括一对线性间隔的针形电极阵列，所述的阵列可以在所述的支撑装置上调整彼此间的相对位置。

4. 根据权利要求 2 所述的设备，其中所述的电极阵列包括环行针形电极阵列，以及开关装置，用于选择性地改变所述的电极的对置电极对的极性。

5. 根据权利要求 4 所述的设备，其中所述开关装置包括旋钮开关，该开关能够选择切换位置，交替地将对置的各对电极连接到所述脉冲发生器上。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的设备，其中所述的电极都是针形电极。

7. 根据权利要求 4 或 5 所述的设备，其中所述支撑装置包括安装在所述轴上的毂盘。

8. 根据权利要求 1 所述的设备，其中所述针状电极中的至少一个具有空心针，适合将分子注入所述组织。

9. 根据权利要求 1、2、4、或 5 所述的设备，其中所述电极相对所述支撑设备是可调的，以便调整刺入深度。

10. 根据权利要求 1 所述的设备，其中所述电极包括适合插入选定组织的管形针，以及能够通过所述管形针插入所述组织的导体（176，178）。

11. 根据权利要求 10 所述的设备，其中所述的针（170，172）可以从所述导体上拆下。

12. 根据权利要求 1、2、或 4 所述的设备，其中所述电场发生器（115）产生施加给组织的电场，该电场的电场强度在 0.2kV/cm 至 20kV/cm 之间，脉冲数在约 1 至 100 之间。

13. 一种用于将分子引入组织的细胞的设备，包括：

一个用于将分子引入组织的装置；

一个支撑装置；

多个电极的电极阵列，所述电极彼此间隔地安装在所述支撑装置上；

一个电脉冲发生器，用于将电信号的脉冲施加给所述电极，以便在所述电极之间的组织中产生一个电场，其中，所述电脉冲发生器具有一个开关装置用于选择性地并将所述电脉冲施加给所选择的所述电极的对置电极对，其中所述电信号的振幅与所述的对置电极对之间的距离成比例，以便在所述电极之间的组织中产生一个电场；

从而将分子引入所述组织的细胞中。

利用电打孔给药和传送基因的治疗设备

本发明所属技术领域

本发明涉及治疗人和其它动物中的疾病，具体地说，涉及一种改进的方法和设备，该方法和设备在患者体内施加受控电场借助电打孔将基因和药物化合物送入患者的活细胞。

本发明的技术背景

在70年代，人们发现电场能够在细胞上打孔且不给细胞带来永久损伤。这项发现使大分子注入细胞质成为可能。人们知道可以通过所谓的电打孔方法将基因和其它分子（如药物化合物）并入活细胞。将基因或其它分子与活细胞在缓冲介质中混合并且施加强电场。细胞膜瞬时变成多孔的，于是基因或分子进入细胞。在那里它们能够改善细胞的基因组。

最近已经有人提出将电打孔作为治疗某些疾病（如癌）的一种途径。例如，在用化疗治疗某些类型的癌症时，必要的是使用足够剂量的药物杀死癌细胞且被杀死的正常细胞的数量又是可以接受的。如果化疗药物能够直接注入癌细胞内部，那么这个目标将能实现。某些最好的抗癌药（如平阳酶素）通常不能穿越某些癌细胞的细胞壁。但是，电打孔使平阳酶素进入细胞成为可能。

电打孔的医疗应用之一是用于治疗癌症。实验室规模的哺乳动物实验已经完成，并且有下述报告： Okino, M.， E. Kensuke ，1990，“The effects of a Single High Voltage Electrical Stimulation with

an Anticancer Drug on *in vivo* Growing Malignant Tumors", Jap. Journal of Surgery. 20: 197-204、Mir. L. M., S. Orlowski, J. Belehradek Jr., 以及 C. Paoletti, 1991, "Electrochemotherapy Potentiation of Antitumor Effect of Blomycin by Local Electric Pulses", Eur. J. Cancer, 27: 68-72。临床试验已经由 Mir. L. M., M. Belehradek, C. Domenge, S. Orlowski, 以及 B. Poddevin 等人完成,并且于 1991 年发表报告: "Electrochemotherapy, a novel antitumor treatment: first clinical trials", C. R. Acad. Sci. Paris, 313: 613-618。

这种治疗是借助直接将抗癌药物注入肿瘤并且将电场施加给一对电极之间的肿瘤完成的。必须合理地精确地调整电场强度,以使肿瘤细胞发生电打孔而且不损伤任何正常细胞(即健康细胞),至少将损伤正常细胞和健康细胞的数量降到最低。对于外部的肿瘤在正常情况下这种治疗容易完成。将电极置于肿瘤的对置的两侧,使电场位于电极之间,然后测量电极之间的距离并且按照公式 E = V/d 将适当的电压施加给电极(公式中E是电场强度,单位是V/cm; V是电压,单位是V; d是距离,单位是cm)。在需要处理内部肿瘤时,适当的确定电极位置和测量电极间距离就不容易了。美国专利第 5,439,440 号揭示了一种适合体内电打孔的电极系统,其中电极可以插入体腔。在美国专利 5,273,525 中,用于电打孔注入分子和大分子的注射器是同时起电极作用的注射针。这就可以将电极放置在皮下插入肿瘤或接近肿瘤的位置,以致能够在该组织中产生肿瘤细胞电打孔所需的预定的电场。

文献 WO-A 94/22526 揭示了一种包括多针电极的用于插入受治组织并限定治疗体积的装置。针是成对排列的,开关依次将来自于脉冲发生器的脉冲送到不同的成对针中。

研究工作业已表明大型核苷酸序列（高达630kb）能够经电打孔导入哺乳动物的细胞，并借此提供一种基因治疗方法。（参阅下述文献：Eanault 等人，*Gene (Amsterdam)*，Vol.144(2)：p305，1994；*Nucleic Acids Research*，Vol.15(3)：p1311，1987；Knutson 等人，*Anal. Biochem.*，Vol.164：p44，1987；Gibson 等人，EMBO J. Vol.6(8)：p2457，1987；Dower 等人，*Genetic Engineering*，Vol.12：p275，1990；Mozo 等人，*Plant Molecular Biology*，Vol.16：p917，1991）

本发明概述

因此，本发明的首要目标是提供一种改进设备，该设备能够方便有效地定位，以便在组织中产生预定的电场。

本发明另一个主要目标是一种改进设备，该设备提供一种方便有效的装置，该装置适合将电极定位到组织中以便将治疗药物注入该组织并将电场施加给该组织。

依据本发明的首要方面适合将电打孔应用于患者身体某个部分的电极设备包括支撑部件；许多对置的针状电极对，它们可调地安装在所述支撑部件上，适合按照选定的的位置和间隔距离插入组织，以及包括信号发生器和开关的装置，将用于产生预定强度电场的电信号施加给选定的电极对。

本发明的另一个方面包括一些针，这些针的作用是将治疗药物注入组织并且作为电极产生适合部分组织细胞的电场。

本发明的另一方面是提供一种治疗方法，该方法利用针阵列装置处理细胞，特别是肿瘤细胞。

附图的简要说明

结合附图阅读下面的详细说明将更容易体会本发明的目标、优点和特征。现将附图简要说明如下:

图 1 是依据本发明的优选实施方案中针组合件的剖面图。

图 2 是图 1 所示实施方案的仰视图。

图 3 是本发明另一个实施方案中组合件的立体图。

图 4 是图 3 所示实施方案组装后的立体图。

图 5 是适合图 4 电极组合件的选择开关的立体图。

图 6a-6b 是图 5 中的开关选择接触位置的图解说明。

图 7 是本发明第三个实施方案的立体图。

图 8 是本发明第四个实施方案的立体图。

图 9a-9d 是俯视图，说明优先选择的电极形式以及使用顺序。

图 10a 和 10b 说明异种移植 Panc-3 的裸鼠体内的肿瘤用平阳酶素进行 ECT 治疗 43 天后的体积(图中 D 表示药物，E 表示电打孔)。

图 11 图解说明在裸鼠体内 Panc-3 细胞瘤在用平阳酶素进行 ECT 治疗后的增长。

图 12a 和 12b 分别说明异种移植非小细胞肺癌（NSCLC）的裸鼠体内的肿瘤用平阳酶素进行 ECT 治疗 20 和 34 天后的体积(图中 D 表示药物，E 表示电打孔）。

图 13 说明异种移植非小细胞肺癌（ NSCLC ）的裸鼠体内的肿瘤用平阳酶素进行 ECT 治疗 34 天后的体积。箭头表示在第 27 天给一只鼠再次进行处理（图中 D 表示药物， E 表示电打孔）。

图 14a 和 14b 说明在分别异种移植 Panc-3 和 NSCLC 的裸鼠试样中在施加脉冲前用新制癌菌素定量给药的效果。

图 14c 和 14d 说明在异种移植 Panc-3 的裸鼠试样中在施加脉冲后用新制癌菌素定量给药的效果。

本发明的最佳实施例

在本文中术语"分子"包括药剂、基因、抗体或其他的蛋白。电打孔在人体治疗应用由两部分组成，包括：将抗癌药物注入肿瘤，以及将电极置于肿瘤对置的两侧并在电极之间施加电压脉冲通过电打孔将药物导入肿瘤，这种治疗方法被称为电化学疗法（ ECT ）。本发明设计的主要目的是为了使如 Okino 和 Mir 等人报告的 ECT 疗法能够在非体表肿瘤（如体内肿瘤）中得以实施。但是它也可以用于其他的治疗应用。

参照图 1 ，该图说明了一种针组合件，该组合件是依据本发明的一个优选的实施方案设计的并且用数字 10 代表它。这个针组合件包括一个细长的管状支撑体 12 ，该支撑体最好是不锈钢的空心轴。中心针座 14 安装在轴 12 的下端并且有一个中心孔 16 ，中心针 18 在该孔中并可顺着该孔滑动。轴 12 包括针的出口槽 20 ，通过该槽针状电极 18 从槽内延伸到槽外，在槽外它借助接线端子 22 紧固在管 12 的外面。

电极 18 的上端可以紧固到螺钉 24 上，以便与电路连接。管座 12 的下端包括螺纹 26 ，安装了许多颗针的针环 28 和制动环 30 被

安装在该螺纹上，制动环的作用是制止针环 28 移动位置，即将针环 28 锁定在某个位置。

许多针 32 安装在沿着针环 28 的外表面等间隔排列的槽 34 中。这样提供了一个等间隔排列的针的环形阵列，在所示的实施方案中为 8 个。借助带形接线端子 36 这些针保持在适当的位置上，带形接线端子 36 的两端借助螺钉螺母 38 紧固在一起，该带形接线端子还起着这些针的电连接作用。带形接线端子 36 直接将这些针固定并保持在适当的位置上。

这个电极组合件是为了在将这些针插入组织时将电能施加给活组织而设计的。中心针 18 作为一个电极，正极或负极，其他的针即环形排列的针 32 作相反的电极。当接线端子安装好并紧固时，所有这些针都保持在固定的位置上。这些针当中有一颗或多颗针可以是筒形或管形的，以便将基因、药物、或其它物质的分子注入该组织。

在一种操作中，应当调整中心针，使它刺入组织达到符合需要的深度。为了做到这一点，松开中心针的接线端子 22 ，让中心针 18 向内或向外滑动，象在图 1 中所见到的那样，以使它从中心针导座 14 中伸出，达到符合需要的刺入距离。然后在该位置将该针夹紧。然后调整环形分布的针 32 ，使它刺入组织达到符合需要的深度。这可以借助松开带形接线端子 36 并使这些针滑到符合需要的位置。可以借助移动针环 28 使它向轴 12 的末端移动或远离该末端上下移动完成辅助调整。治疗物质可以通过这些针当中的一颗或多颗针注入该组织，或者借助单独的设备注入该组织。

在所有的针都调整到适当的刺入深度之后，握紧轴 12 把针插入组织达到符合需要的深度。然后，将适当的脉冲发生器与电极组合件连接起来并且将适当的电压施加给电极。在施加电压之前，将适

量的治疗物质，如基因或用于处理该组织的适当的化学物质或药物的分子注入组织。

这种电极组合件的改进方案可以包括一个在中心电极位置上的实心的非刺入电极（未示出）。非刺入的中心电极可以是任何适当形状的导体，例如钮扣形或平板形，它安装在轴 12 的末端并且与组织表面接触。应当调整环形排列的针，使它们在中心电极被支撑在组织表面上时刺入组织并达到符合需要的深度。电能从刺入的针经过组织流向表面上的中心电极。为了治疗接近表面的肿瘤可以采用这些安排，在这种场合电极的环形阵列是为包围肿瘤而设计的。中心电极的定位使得电能通过组织流向中心电极。

这种电极组合件的其它优点包括所有的针 18 和 32 都能够独立地调整，以达到符合需要的刺入深度。针环 28 也可以调整，使它离开轴 12 的末端定位，以致能够直接观察中心针和环形排列的针的插入。此外，为了包围待处理的组织区域，针环 28 可以具有任何尺寸和结构。针还可以按照图 3-6 所描述的成对地启动。

参照图 3 和图 4，该图说明了针状电极环形阵列组合件的替代实施方案，并且通常用数字 40 代表。这种针组合件包括针 42 至 52 的环形阵列，这些针等间隔地安装在毂盘 54 中，该毂盘安装在细长的圆柱形轴 56 上。毂盘 54 最好有适当选定的直径，以便提供围绕着肿瘤或其它待处理的组织定位所需要的阵列直径。这些针当中可以有一颗或多颗针是空心针以便能够注入治疗物质的分子，后面将更全面地叙述。

电接线插座组合件包括座体 58，座体有中心孔 60，轴 56 将安装在该中心孔内，以及环形针座阵列 62 至 72，针 42 至 52 的一端容纳在针座中。针座 62 至 72 将实现针 42 至 52 与接线端子 74 至 84 的电连接，接线端子又与电流分配器连接，下面继续介绍。

电接线器插座组合件 58 装配到轴 56 上，于是针的一端插入针座 62 至 72，与接线端子 74 至 84 完成电连接。将安装好针阵列毂盘 54 和插座 58 的轴 56 安装到适合握持的手柄 86 上。手柄 86 呈长圆柱形状，适合用手握持操作。手柄 86 上有一个朝前的插座，该插座有朝前延伸的管状轴 88，管状轴上有孔 90，当轴 88 插入接线器部件 58 内的孔（未示出）时，轴 56 插入孔 90。轴 56 插入孔 90 并且轴 56 上有环形槽 92，借助轴颈锁定器将该槽锁定，该轴颈锁定器包括在横置孔 96 中偏向一侧的横置销 94，并且有容纳轴颈 92 并将它锁定在手柄中的孔 98。弹簧 102 安装在孔 96 中使横置销 94 偏置到锁定位置。按压横置销 94 的一端 100，可以松开轴 56，将它取出。

当手柄如图 4 所示装配时，可以用手握紧手柄把针插入选定的组织区。优先选择调整针 42 至 52 的距离，使这些针定位在待治疗的组织周围。如上所述，这些针 42 至 52 当中可以有一颗或多颗针是空心针，用于注入需要的治疗药物。然后，将电极接线端子 74 至 84 按优先选择的配置接到旋转开关组合件上，如图 5 所示，利用该旋转开关选择需要激活即需要施加电压的对置的电极对。

开关组合件通常用数字 104 表示，该组合件包括固定的圆柱形壳体 106，在壳体中安装着转轮 108，转轮上有隔开的接触片 110 和 112，这一对接触片通过一对接线器 114 和 116 与脉冲功率发生器 115 相连。旋转转轮改变接触片 110 和 112 在壳体 106 中的位置，使它们与环形排列的与接线端子 74 至 84 连通的触点 118、120、122、124、126、和 128 接触。

参照图 6a 至图 6c，转轮 108 上有内部的接触片 110 和 112，每个接触片可以在触点 118 至 128 中桥接两个触点，这些触点又通过接线端子 74 至 84 与脉冲源连通。内部的接触片 110 和 112 随着

转轮 108 旋转，选择接触位置，确定与内部触点 118 至 128 当中哪些触点对连通，借此确定激活哪对对置的针状电极。这样使操作者能够依据最佳治疗方案围绕着选定的组织选择电极位置和电场方向。转轮 108 使操作者能够选择如何产生电场，是从各个方向包围组织还是穿越组织。

参照图 7，它说明本发明另一个实施方案，在这个方案中产生电场的电极阵列平行设置并且相对位置可以调整。电极组合件以数字 130 表示，该组合件包括一对针状电极阵列 132 和 134，这对阵列包括安装在绝缘的支撑零件 140 上的导电的针状电极 136 和 138。针阵列 132 保持在固定夹具 142 中，允许以支撑为基准调整针 136 的深度。

针 138 安装在活动夹具 146 中，借助紧固螺钉 148 可以调整该夹具的位置。在针 136 和 138 中，每根针上都有限制刺入深度的制动环 144。在设置间距的紧固螺钉 148 将夹具 146 按照选定的位置固定在支撑 140 上。间距传感器 150 感受针阵列 132 和 134 之间的距离并产生一个信号，通过电缆 152 将该信号传送给脉冲发生器。脉冲发生器借助电缆 154 和 156 与针状电极相连。

参照图 8，它说明针座的详细结构，该针座通过各种排列方式建立不同形态的针阵列，即拉开距离的一对针，或平行的针阵列。这个实施方案包括一个底座 158，该底座上有许多毗邻的平行槽 160，针 162 和 164 可以按照选定的相对位置固定在该平行槽中。如图所示，这个针座可以用于安装一对极性相反的针状电极 162 和 164。可以选择这些针的相对位置，使它们定位于选定组织的两侧。借助夹板 159 将针锁定在槽中。此外，该针座可以与附加针座结合使用，以便在选定组织的对置的侧面提供多重阵列。图示的针可以经接线端子 166 和 168 与适当的脉冲发生器连接。

参照图 9a 至图 9d，这些图对本发明做了补充说明。正象清楚的图解说明那样，组合电极可以采取多个单针 170 和 172 形式，使用时首先将针插入选定的组织区，或插在选定组织区的侧面，例如插在图示的肿瘤 194 的两侧。然后，将针与注射管或其他的分子源连接起来，将选定的分子溶液注入组织区。这些针可以是不导电的，将一对电极 176 和 178 通过相应的针孔腔送入该组织，如图 9b 所示，然后将针拔出，如图 9c 所示。每个电极 176 或 178 备有一段绝缘导线 180 或 182 以及一个电极引出头 184 或 186 。

然后，可以用小型接线夹 192 和 194 将来自适当的功率发生器的一对导线 188 和 190 与电极引出头连接起来，在电极之间施加电压，如图 9d 所示。这样在组织中产生电场，并用电场在选定的组织如肿瘤等中的细胞上开孔。这种电打孔可以使选定的分子进入组织细胞，可以象希望的那样更有效地杀死该细胞或改变该细胞。这种形式的针还可以在上述的任何组合件或全部组合件中使用。

上述的各种针状电极组合件使电极能够定位在体内的肿瘤或其它组织中，或者定位在体内的肿瘤或其它组织附近。虽然本发明应用的核心是电化学疗法，但是，本发明的各种实施方案可以用于其它治疗，如某些身体器官的基因治疗。

待产生的电场性质由组织的性质、选定组织的大小和位置确定。符合需要的电场是幅度正确并且尽可能均匀的电场。电场强度过大将导致细胞溶解，电场强度过低将导致降低效力。电极可以有许多种安装和操作方式，包括但不限于在原始应用中采用的那些方式。可以按照常规用手术钳在体内操作电极。

由脉冲发生器提供的电信号波形可以是指数衰减型脉冲、方波脉冲、单极性振荡脉冲串、或双极性振荡脉冲串。电场强度可以是 0.2kV/cm 至 20kV/cm 。脉冲持续时间可以是 10 μsec.至 100 msec.。

脉冲个数可以从 1 个至 100 个。当然，波形、电场强度和脉冲持续时间都还要取决于细胞的类型和需要通过电打孔进入细胞的分子类型。

包括给已知的细胞电打孔需要的电场强度在内的各种参数可以从许多相关的研究报告中获得，也可以从 Genetronics 有限公司（ San Diego, Califonia，本申请的受让人）保存的数据库中获得。体内细胞电打孔，如电化学疗法（ ECT ）需要的电场在幅度上与该细胞在体外的需要的电场相似。这个幅度在 100V/cm 至每厘米若干千伏范围内。这已经通过发明人自己的实验以及其他人在科学出版物中报告的实验得到证实。在电化学疗法领域中首次给活体施加脉冲电场治疗肿瘤是 1987 年由 Okino 在日本报告的。

多年来，用于完成文中所述程序的脉冲发生器可以按照牌号在市场上购买。一种适用的信号发生器是 ECM600 型细胞电控器（ ELECTRO CELL MANIPULATOR ），可以从 Genetronics 有限公司（ San Diego, Califonia, U.S.A. ）购买。 ECM600 型信号发生器通过电容完全放电产生脉冲，结果是指数衰减型波形。这种信号发生器产生的电信号可以用短暂的跃升时间和指数型衰减表示其特征。在该信号发生器中，电打孔脉冲持续时间可以通过在 10 个时间寄存器中选择一个来设定，用 R1 至 R10 标明该组时间寄存器。可以采用两种模式操作它们，高压模式（采用 50 微法的电容器）和低压模式（采用 25 微法至 3,175 微法的电容器）。

ECM600 型信号发生器有一个控制按钮，该控制按钮允许调整给电容器充电的电压幅度，在低压模式中该电压在 50V 至 500V 之间，在高压模式中该电压在 0.05kV 至 2.5kV 之间。电信号的幅度显示在 ECM600 型信号发生器的显示器上。这台装置进一步包括许多

在低压模式中控制脉冲持续时间的按钮开关，借助将输出和由 7 个供选择的附加电容器与一些电阻同时并联来控制脉冲持续时间。

ECM600 型信号发生器还包括一次性自动充放电的脉冲控制按钮。按下这个按钮启动一个自动循环，该循环包括给内部电容器充电至设定电压，然后将脉冲提供给外部的电极，每个循环所需时间不足 5sec.。可以连续地按压手动按钮，重复施加预定的电场。

本发明的治疗方法优先选择利用方波脉冲电打孔系统。例如，可以使用从 Genetronics 有限公司购买的 T820 型方波电打孔器（ ElectroSquarePorator (T820)）。

方波电打孔系统提供受控的电脉冲，该脉冲迅速地跃升到设定电压，在该电压停留至设定的时间长度（脉宽），然后迅速跌落至零。就给植物原生质体和哺乳动物细胞系列电打孔而论，这种类型系统的转化效率优于指数衰减型系统。

T820 型方波电打孔器是市场上第一个市售的能够产生高达 3000V 电压的方波电打孔系统。其脉宽可以在 5μsec.至 99 msec.之间调整。方波电打孔脉冲对细胞的影响比较温和，使细胞有较高的存活能力。

T820 型方波电打孔器可以在高压模式（ 100 至 3000V ）和低压模式（ 50 至 500V ）两种模式下发挥作用。对于低压模式脉宽大约是 0.3 至 99 msec，对于高压模式脉宽大约是 5 至 99μsec.。 T820 具有提供多次脉冲的能力，脉冲次数大约在 1 次至 99 次之间。

Mir 和另一些人已经将方波脉冲用于电化学疗法，这种方法允许将治疗药物注入恶性肿瘤。曾经给实验鼠注射低剂量的平阳酶

素。然后，给恶性肿瘤电打孔，结果导致肿瘤减小或完全消失（参阅 Mir, L.M.， *Eur. J. Cancer*， Vol.27(1)， p68， 1991 ）。

Saunder 已经在植物的原生质体的电打孔方面对方波脉冲和指数衰减型脉冲做了比较。与指数衰减型脉冲相比，方波电打孔产生更高的转化效率。他还报告说，采用方波脉冲在优化电打孔参数时更容易，因为在更大的电压范围内能够产生充分的转化效率（参阅 Saunder 的 “ Guide to Electroporation and Electrofusion”， pp227-247， 1991 ）。

本发明的治疗方法包括电疗（也叫做电打孔施药疗法），它利用本发明的装置将大分子提供给细胞或组织。如前所述，文中所用术语“大分子”或“分子”指的是药物（例如化疗制剂）、核酸（例如聚核苷酸）、包括抗体的肽和多肽。聚核苷酸包括 DNA 、 cDNA 和 RNA 序列。

在本发明中试图使用的药物通常是具有抗癌或溶解细胞作用的化疗药物。这类药物或制剂包括平阳酶素、新制癌菌素、苏拉明、和二氨二氯络铂。其他的化疗制剂是本领域技术人员已知的抗癌药物（实例见 “ The Merck Index ” ）。制剂的化学组成将确定与施加电脉冲相关的适当的给药时间。例如：在不受具体的理论约束的同时，据信，为了避免在电场内携带较多电荷的药物的静电相互作用，如果采用电打孔后给药，等电（离）点（ isoeletric point ）低的药物（例如，新制癌菌素， IEP = 3.78 ）可能更有效。此外，象平阳酶素这样的药物，它们有非常负的 logP 值（ P 是辛醇与水之间的分配系数），非常大的尺寸（ MW = 1400 ），而且它们是亲水的，借此与脂质薄膜紧密结合，所以，它们扩散进入肿瘤细胞非常缓慢，通常在施加电脉冲之前或基本上与施加电脉冲同时给药。电打孔借助在细胞膜上打孔促进平阳酶素或其它类似的药物进入肿瘤细胞。

借助本发明的方法将分子导入细胞调整基因表达是符合需要的。术语“调整”是一种设想，即在基因表达过分表达时，压缩基因表达；在基因表达欠表达时，扩展基因表达。在细胞增生机能失调与基因表达相关的场合，可以采用在转译级干扰基因表达的核酸序列。例如，这种途径利用反义核酸（ antisense nucleic acid ）、核酶、或三倍体（ triplex ）制剂阻断特异的 mRNA 的转录或转译，或者借助反义核酸或三倍体制剂遮蔽 mRNA ，或者借助核酶剪切 mRNA 。

反义核酸是 DNA 或 RNA 分子，它至少与部分的特异性 mRNA 是互补的（见 Weintraub, *Scientific American* ， Vol.262 ， p40 ， 1990 ）。在细胞中，反义核酸与相应的 mRNA 杂交，形成双链分子（ double-stranded molecule ）。因为细胞不转译双链的 mRNA ，所以，反义核酸干扰 mRNA 的转译。优先选择大约 15 个核苷酸的反义寡聚物，因为它们容易合成而且在导入目标细胞时出现的问题可能比大分子要少。使用反义方法抑制体外基因的转译在技术上是已知的（ Marcus-Sakura ， *Anal. Biochem.*， Vol.172 ， p289 ， 1988 ）。

作为三倍体策略，运用寡聚核苷酸阻止转录是已知的，因为寡聚物缠绕双螺旋的 DNA ，形成三股螺旋体。所以，为了识别在选定基因上的特征位（ a unique site ）可以设计这些三倍体化合物（ Maher 等人， *Antisense Res. and Dev.*, Vol.1(3), p227, 1991 ; Helene, C., *Anticaner Drug Design*, Vol.6(6), p569, 1991 ）。

核酶是一类 RNA 分子，它们拥有剪切单股的 RNA 的能力，与 DNA 限制性核酸内切酶的方式类似。通过修饰给 RNA 编码的核苷酸序列，就可以设计能识别 RNA 分子中特异的核苷酸序列并剪切它的分子（ Cech, *J.Amer. Med. Assn.*, Vol.260, p3030, 1988 ）。这种

途径的优点是，因为它们的序列特异性，所以只有具有特异序列的mRNA失去活性。

有两种基本型的核酶，四膜虫属型（Hasselhoff, *Nature*, Vol.334, p585, 1988）和“双髻鲨”型。四膜虫属型核酶识别长度是四个碱基的序列，而双髻鲨型核酶识别长度是11至18个碱基的序列。识别的序列越长，在目标mRNA中排他地发生该序列的或然率就越大。因此，在两种类型的核酶中，优先选择用双髻鲨型核酶去除特异的mRNA的活性，并且为了较短的识别序列，优先选择18个碱基的识别序列。

本发明还提供基因疗法，用于治疗由于特异的基因或由于缺乏基因引起的细胞增生机能失调或免疫机能失调。这种疗法将借助将特异性有义或反义的多核苷酸导入机能失调的细胞达到它的治疗效果。利用重组诸如嵌合病毒（a chimeric virus）类的表达载体能够实现多核苷酸的供给，或者象实例中“裸露的”DNA那样提供多核苷酸。

诸如文中所述的可用于基因疗法的各种病毒的载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘、或优先选择的RNA病毒（如逆病毒（retrovirus））。逆病毒的载体最好是鼠型或鸟型逆病毒的衍生物。能够插入单一异体基因（a single foreign gene）逆病毒的载体包括但不限于：Moloney鼠型白血病病毒（MoMuLV）、Harvey鼠型肉瘤病毒（HaMuSV）、鼠型乳房肿瘤病毒（MuMTV）、以及劳氏肉瘤病毒（RSV）。当对象是人时，可以利用诸如长臂猿白血病病毒（GaLV）那样的载体。许多补充的逆病毒载体能够合并多种基因。所有这些载体都能转移或合并有可选择标记的基因，以致能够识别和产生转导的细胞。

治疗用的肽或多肽也可以被包括在本发明的治疗方法之内。例如，可以提供免疫调节剂和生物学反应修饰剂，以被细胞摄入。术语“生物学反应修饰剂”指的是涉及改善免疫反应的物质。免疫反应修饰剂的实例包括淋巴细胞因子之类的化合物。淋巴因子包括肿瘤坏死因子、白细胞介素 1 、白细胞介素 2 和白细胞介素 3 、淋巴细胞毒素、巨噬细胞活化因子、迁移抑制因子、群落刺激因子、以及α干扰素、β干扰素、γ干扰素和它们的子型。

还包括多核苷酸，它为新陈代谢酶和蛋白质编码，包括给抗血管形成化合物，如因子 VIII 和因子 IX 编码。

本发明的大分子还包括抗体分子。文中所用术语“抗体”意思是完整的分子以及它们的碎片，如 Fab 和 $F(ab')_2$ 。

按照本发明，提供多核苷酸或多肽的给药可以是多种方式的，例如，胃肠外注射、快速输液、鼻咽吸收、皮肤吸收、或口服。例如，在治疗肿瘤时，电化学疗法制剂或其它制剂可以局部给药、有计划地注射或直接注入肿瘤。举例说，在直接将药物供给肿瘤时，按“扇面”方式注射药物是有利的。术语“扇面”指的是为了使药物更好地散布到肿瘤的各个部分，注射时，改变针的方向，或者按多个方向多次注射，就象打开的折扇一样多方向给药，而不是集中在一处。与在这项技术中通常使用的药物体积相比，为了使药物适当地散布到肿瘤的各个部分，在向肿瘤给药（如注射）时，增加药物溶液的体积是符合需要的。例如在文中的实施例中，熟悉这项技术的人通常注射 50 μl 药物溶液，但是，将药物溶液体积增加到 150μl 结果得到更大改进。优先选择非常缓慢地在肿瘤的周围注射药物，而不是在潮间压力非常高的肿瘤中心注射药物。

优先选择给药与电打孔处理基本同时进行。术语“基本同时进行”意思是提供分子和电打孔处理的时间适当地接近。提供分子(即

治疗药物)的时间间隔是任意的，这取决于诸如肿瘤的性质、患者的状况、分子的大小、化学特性以及半衰期。

胃肠外给药的制剂包括无菌水、水性溶液和非水性的溶液、悬浮液和乳浊液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙烯醇、植物油（如橄榄油）、以及可注射的有机酯（如乙基油酸酯）。咬合整饰的载体可以用于增加皮肤的渗透性和提高抗原的吸收。适合口服给药的液体制剂形式通常可以包括包含液体制剂形式的微脂粒溶液。适当的微脂粒悬浮形式包括包含通用稀释剂（如纯水）的乳浊液、悬浮液、溶液、糖浆、以及酏剂。除稀释剂之外，这些组合物还包括辅剂、润湿剂、乳化剂和悬浮剂。进而可以采用血管收缩药剂，以使治疗药物在施加脉冲前保持在指定位置。

任何细胞都可以用本发明的方法处理。文中提出的实施例说明本发明方法在处理肿瘤细胞，如胰和肺中的癌细胞中的运用。其它细胞增生机能失调也可以借助本发明的电打孔方法处理。术语“细胞增生机能失调”指的是恶性的以及良性的细胞群体，该群体往往在形态上和遗传基因上不同于周围组织。恶性细胞（即肿瘤或癌）的发展是多个步骤的结果。本发明的方法在处理恶性肿瘤或各种器官系统的机能失调当中是有用的，例如，在处理胰和肺中的细胞时特别有用，也还包括心脏、肾、肌肉、乳腺、结肠、前列腺、胸腺、睾丸以及卵巢中的细胞。优先选择的对象是人的细胞。

下面的实施例旨在说明但不是限制本发明。这些实施例是可能使用的范围中典型的实例，对于熟悉这项技术的人可以采用其它已知的替代方法。

本发明的最佳实施例

下述实施例说明电化学疗法（ ECT ）的运用，将分化不充分的人体胰腺肿瘤（ Panc-3 ）皮下异种移植到裸鼠的左肋部，并用 ECT 处理。单一处理程序涉及将平阳酶素（在 0.15ml 盐水中 0.5 个单位）按前述用“扇形”方式注射到肿瘤内部，接下来，在 10 分钟之后，利用本发明的沿着 1cm 直径的圆周排列的针阵列电极施加 6 个方波电脉冲。为了适应大小各异的肿瘤，还可以使用各种直径的针阵列（例如， 0.5cm 、 0.75cm 、和 1.5cm ）。各种高度的止动器可以插在阵列的中心，以使针刺入肿瘤的深度可以变化。内藏的机构允许切换电极，以使脉冲电场最大限度地覆盖肿瘤。电参数是：1300V/cm 和 6 × 99 μsec 的脉冲，间隔 1sec.。

结果表明在处理现场几乎所有实验鼠都有严重坏死和水肿。在处理之后，处理组（ D+E+； D 代表药物， E 代表电场）的实验鼠肿瘤体积都大幅度减小，而对照组（ D+E-）的实验鼠肿瘤体积都显著增加。我们观察到在 ETC 处理 28 天后 90%的实验鼠肿瘤几乎完全退化， 10%的实验鼠没有反应。在最初处理 77 天后，观察到处理组中 60%的实验鼠已经完全退化，没有可触摸的肿瘤。但是，在处理 35 天后，有 20%的实验鼠肿瘤再次增长，但增长速度比对照组要小得多。这个观察结果与针的深度小于肿瘤的尺寸 Z 造成的原始大肿瘤的处理不完全有关。肿瘤样品的组织学分析表示在 D+E+ 组中坏死的肿瘤细胞的空胞与 D+E-组中有生命力的细胞和坏死细胞混合物的对比。利用异种移植非小细胞肺癌（ NSCLC ）肿瘤的裸鼠进行的初步研究也已表明采用平阳酶素和 ECT 处理取得了非常令人鼓舞的结果。

实施例 1

肿瘤细胞系列 Panc-3，一种分化不完全的胰腺癌细胞系，由抗癌有限公司（ AntiCancer Inc., San. Diego ）提供。为了进行 ECT 实验，取自保留肿瘤细胞系的鼠的组织解冻后切成非常小的片，每片大约 1mm，然后用外科手术将 8 至 10 片异种移植到在裸鼠左肋制作的皮下气囊中，再外科缝合 6.0 针。在肿瘤平均尺寸达到大约 5mm 之后，有可触摸肿瘤的实验鼠随机的分成两组， 10 只作对照组（ D+E-； D 代表药物， E 代表电场），10 只作 ECT 处理组（ D+E+），即在注射平阳酶素之后用 BTX T820 型方波发生器施加脉冲。测量肿瘤的尺寸，并用下式计算肿瘤体积:

$$(II/6) \times a \times b \times c$$

其中 a，b，c 分别是肿瘤的长度、宽度和厚度。 0.5 个单位的平阳酶素溶解在 0.15 ml 的 0.9%氯化钠水溶液中，然后用扇面方式注射到对照组（ D+E-）和处理组（ D+E+）中每只实验鼠的肿瘤中。在注射药物 10 分钟后，（ D+E+）组的每只实验鼠都用配备本发明介绍的针阵列电极的 T820 型方波电打孔器进行电脉冲处理。使用的电参数如下: 电场强度 1300V/cm； 6 个脉冲，每个脉冲 99 μsec.，间隔 1 sec 。

每天监视实验鼠的死亡率并且记录病情的任何变化。有规律地定时测量肿瘤尺寸，监视肿瘤的生长情况，退化和（或）增大。另外一组异种移植非小细胞肺癌系列的裸鼠也用相同于 Panc-3 肿瘤的方法进行处理。

图 10a 和图 10b 表示对于 Panc-3 肿瘤在使用平阳酶素并作 ECT 处理后的 43 天周期内确定的肿瘤体积的分析结果。在经过处理和没有经过处理的实验鼠之间肿瘤体积有显著的差别。在处理 24 天

后基本上没有可探测的肿瘤。图 10 的结果还总结于表 1 。肿瘤实际退化的图示说明示于图 11 。

表 1 裸鼠体内 Panc-3 肿瘤的电化学疗法治疗

处理后的天数	肿瘤体积 (mm^3)C1	肿瘤体积 (mm^3)C2	肿瘤体积 (mm^3)T1	肿瘤体积 (mm^3)T2
0	138.746	148.94	123.11	178.37
1	206.979	179.82	210.95	252.72
8	394.786	451.787	104.55	211.11
15	557.349	798.919	113.21	226.966
18	939.582	881.752	161.73	246.91
24	1391.057	1406.98	41.56	47.2228
28	1628.631	1474.21	0	0
35	2619.765	2330.31	0	0
38	2908.912	2333.967	0	0
43	3708.571	5381.759	0	0

细胞系：人体的分化不充分的胰腺肿瘤(Panc-3)

鼠型：裸鼠； 移植：皮下异种移植

对照组： C1 和 C2 ； 处理组： T1 和 T2

利用抗癌公司提供的非小细胞肺癌细胞系 177 (NSCLC, 177 (AntiCancer, San Diego, CA))作了 Panc-3 实验的重复实验。实验结果示于图 12a 和图 12b，并且与用平阳酶素和 Panc-3 的实验结果相似。在一个实验中，在第 27 天对一个复发的肿瘤重新作了处理（图 13 ），并且在 7 天后肿瘤的迹象消失。

按照前面强调的程序，用新制癌菌素（ NCS ）模拟上述的 Panc-3 和 NSCLC 实验。如图 14a 和 14b 所示，与研究平阳酶素时

所用的给药方式类似，在施加脉冲前用 NCS 给药，结果表明在减小肿瘤尺寸方面全然没有效果。我们认为这是由于 NCS 的等电（离）点低，静电相互作用阻碍了药物进入肿瘤细胞。所以，采用先加脉冲并且在施加脉冲后注射 NCS 的办法作了重复实验。

图 14c 表示经过处理的 7 只实验鼠（代号 ID1-7 ）的肿瘤初始体积(I)和第 13 天肿瘤最终体积的比较。我们观察到其中有几只实验鼠（ ID1, 2, 4, 和 7 ）的肿瘤体积有所增加，但这种增加似乎是水肿的结果。但是，如图 14d 所示，在研究另一组 5 只实验鼠时，在第 23 天所有的实验鼠的肿瘤体积都明显地减小。

比较图 14a, 14b 和图 14c, 14d 表明在施加脉冲后注射 NCS 比在施加脉冲前注射 NCS 更有效。

结论

这些实施例说明利用平阳酶素或 NCS 和针阵列电极借助电化学疗法能够有效地处理异种移植到裸鼠身上的分化不充分的胰腺癌（ Panc-3 ）和非小细胞肺癌（ NSCLC ）。其它类似的化疗制剂利用本发明的方法可能也是有效的。

结果表明经过一次处理 77 天后处理组中有 60%达到完全退化，没有可触摸的肿瘤。观察到部分退化的(肿瘤体积减少 80%)占 30%，而只有 10%没有反应（表 2 ）。

表 2 用平阳酶素和电化学疗法治疗 Panc-3

处理后的天数	28	35	57	77
CR(100%)	6	6	6	6
PR(80%)	3			
NR(%)	1	1	1	1
致死				2*
肿瘤再次生长		2		
重新处理			2	
组织学		1		

经过处理的实验鼠数: 10

CR: 完全退化; PR: 部分退化; NR: 没有反应

* 1 只实验鼠在重新处理后死亡; 1 只实验鼠生存 64 天后死亡

组织学研究清楚地表明对于经受 ECT 处理的一组肿瘤区出现严重的坏死，反之在对照组中没有出现坏死。业已发现，与施加脉冲前按常规方法注射药物相比，为了使药物最大限度地均匀分布在整个肿瘤中，以扇面方式将体积更大的平阳酶素注射到肿瘤内部是非常有效的方法。

尽管已经结合优选的实施方案介绍了本发明，但是应当理解，不脱离本发明的精髓可以作出各种修改方案。因此，本发明只受权利要求书的限制。

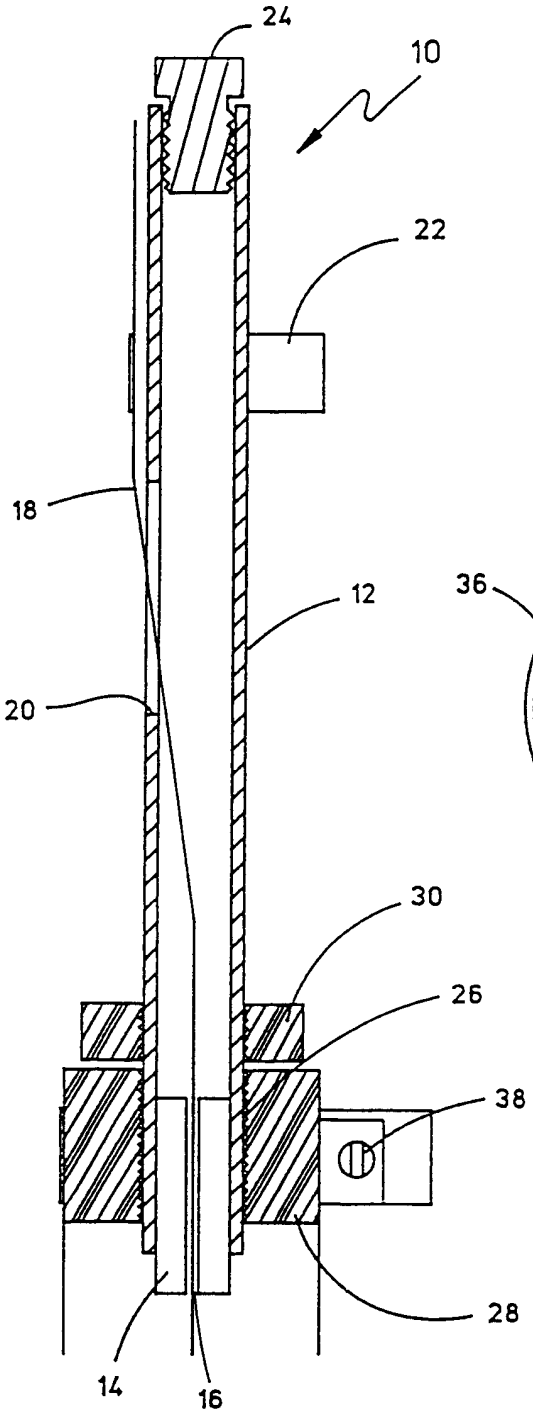


图 1

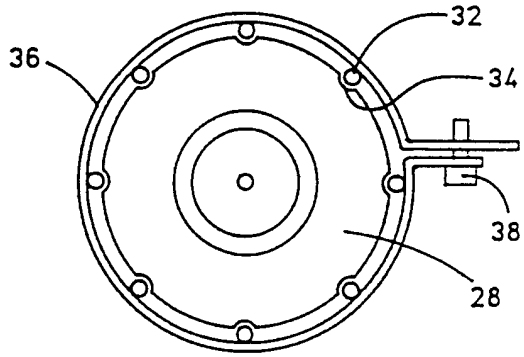


图 2

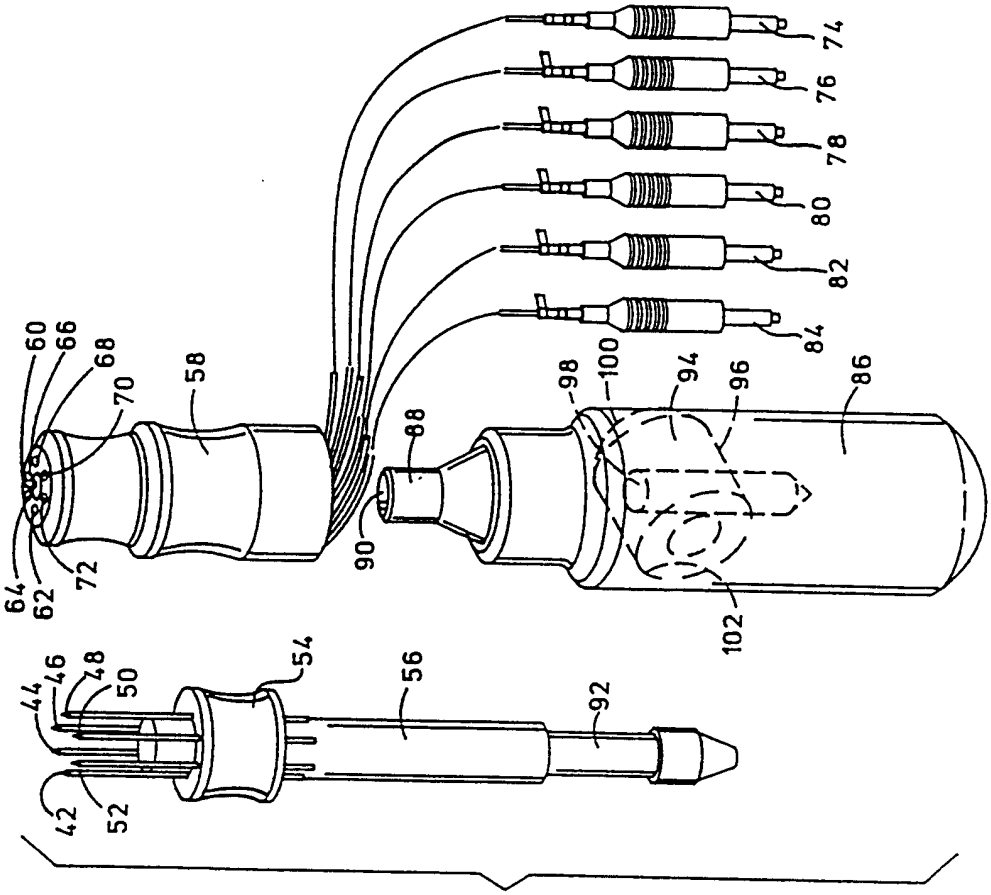

74
76
78
80
82
84
60
66
68
70
58
64
62
72
90
88
98
100
94
96
86
102
44
46
48
50
54
56
92
42
52

图 3

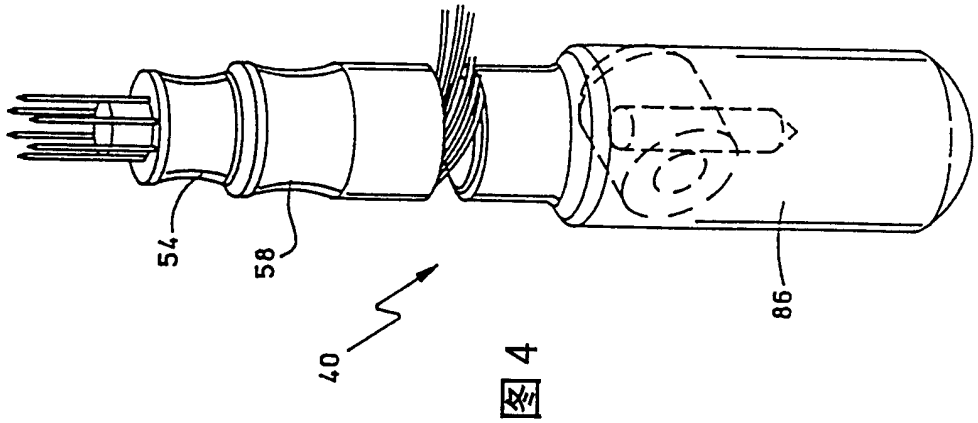

54
58
40
86

图 4

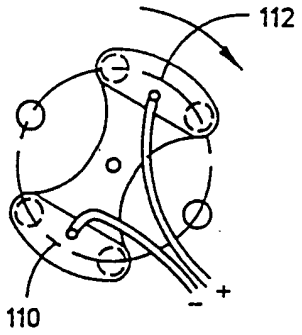


图 6a

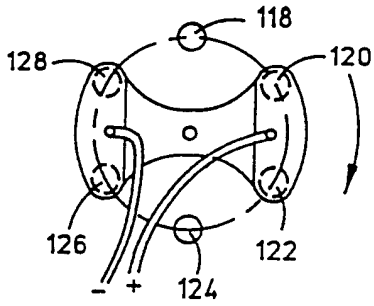


图 6b

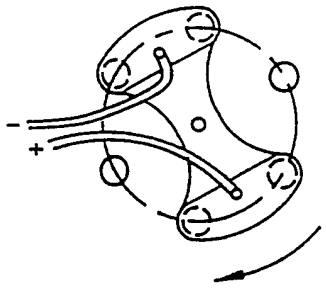


图 6c

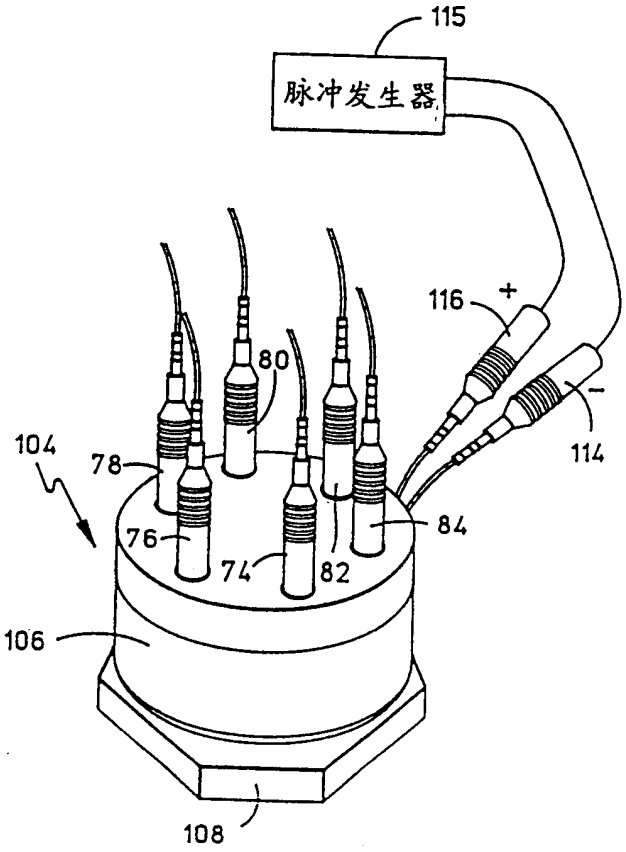


图 5

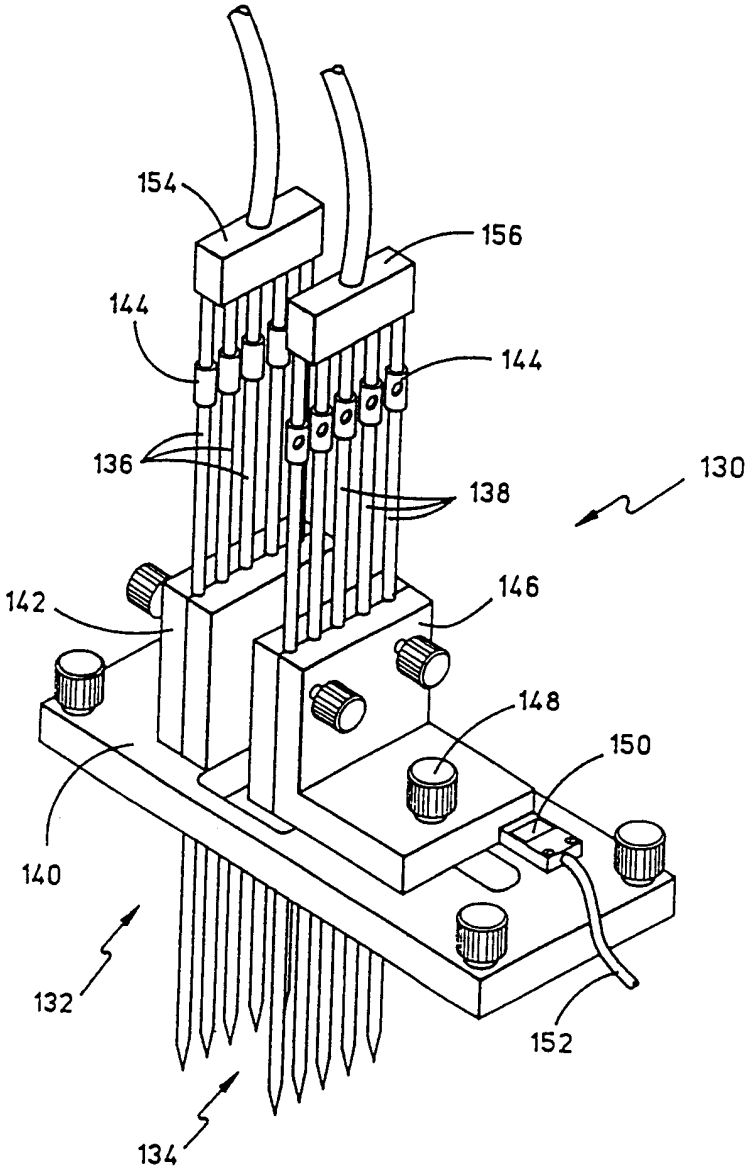


图 7

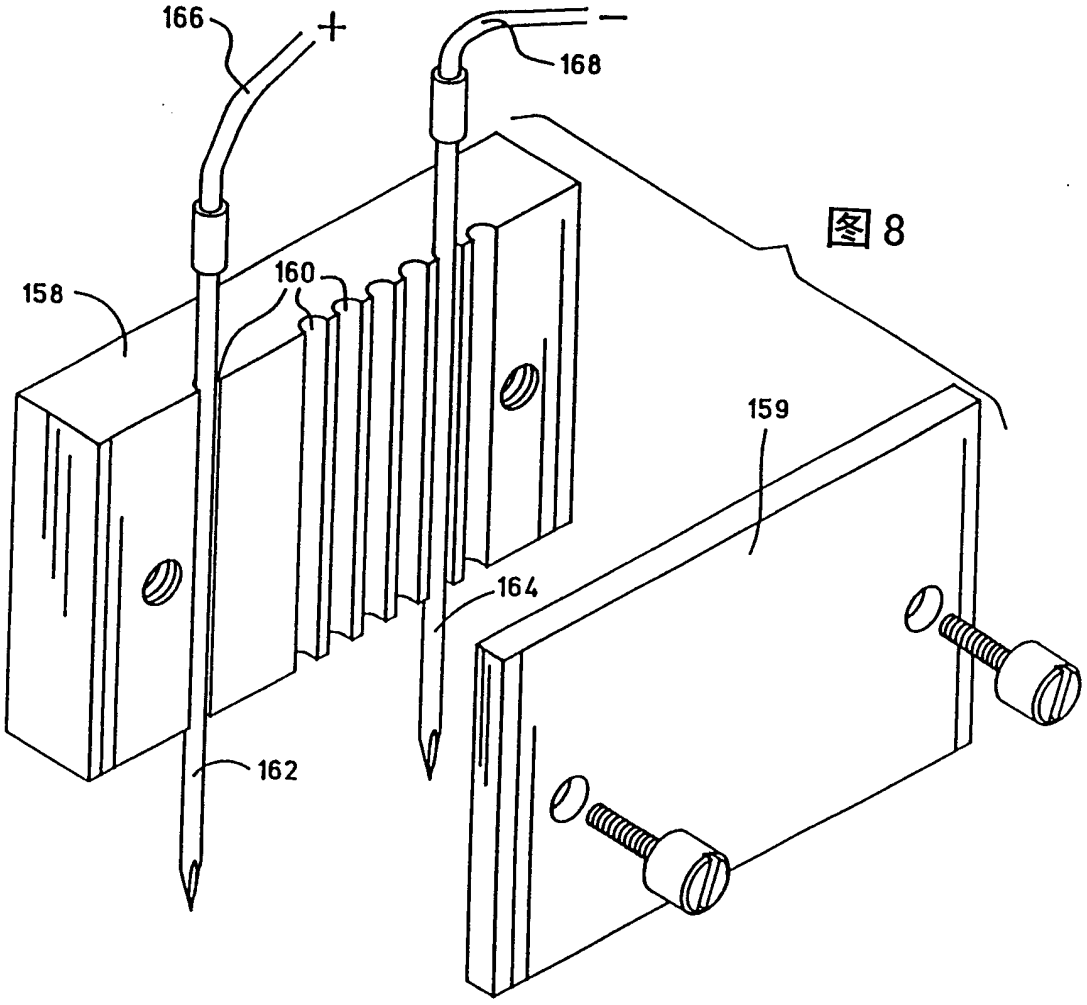


图 8

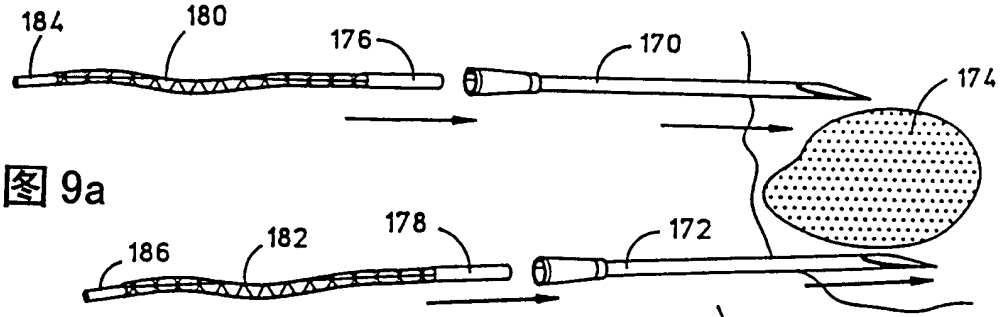


图 9a

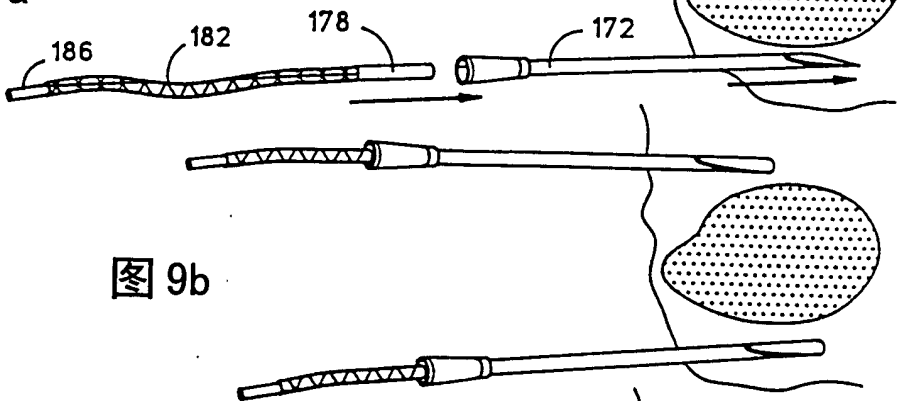


图 9b

图 9c

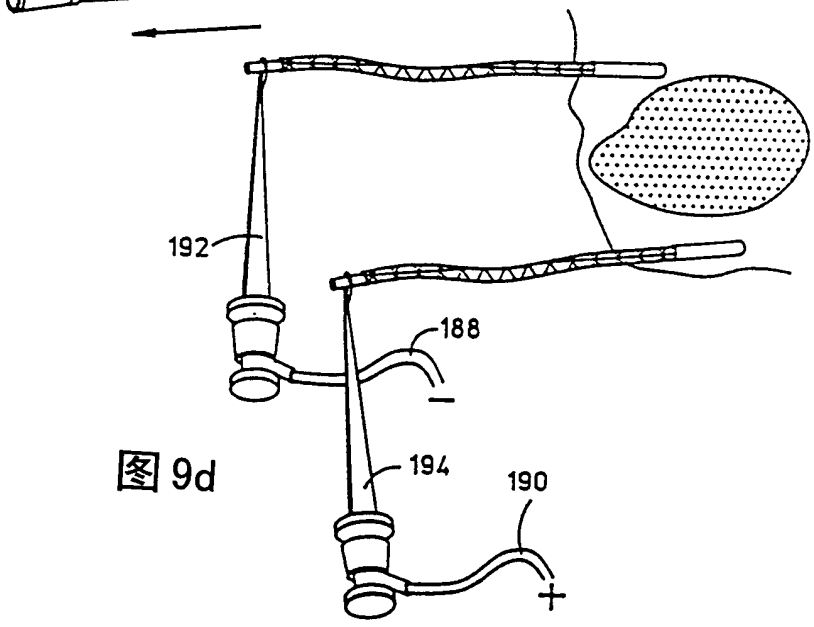


图 9d

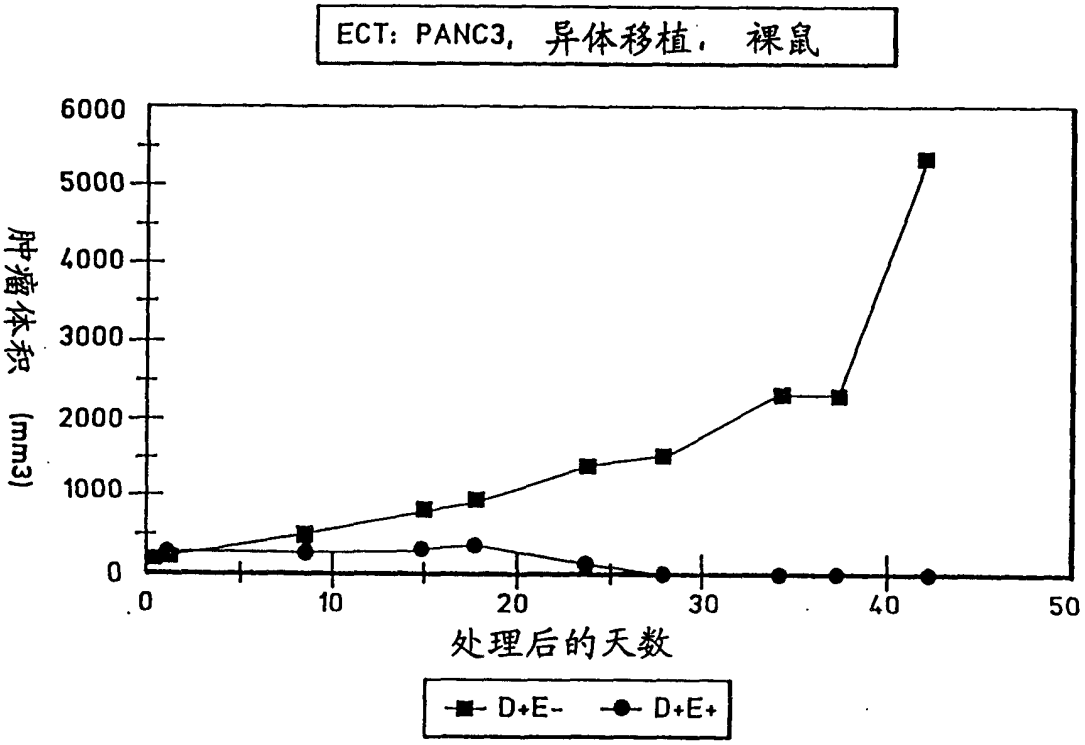

ECT: PANC3, 异体移植, 裸鼠
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
肿瘤体积 (mm3)
0
10
20
30
40
50
处理后的天数
D+E-
D+E+

图 10a

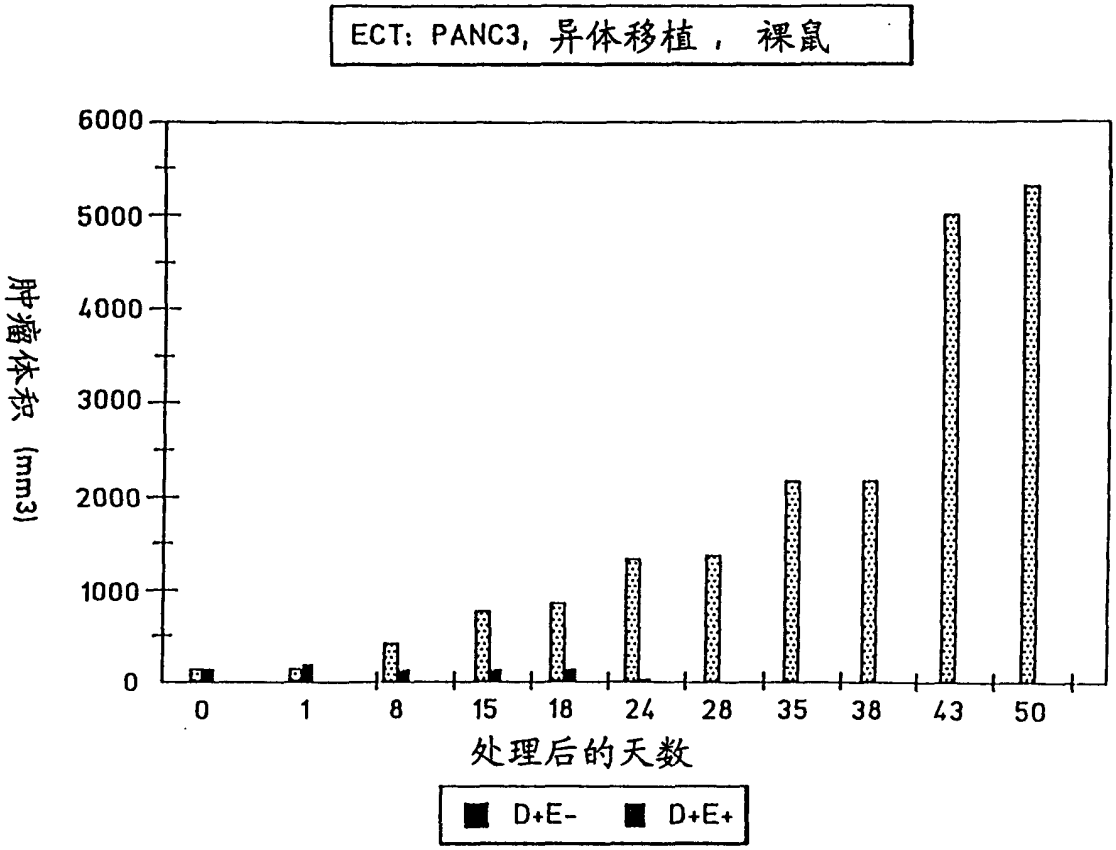
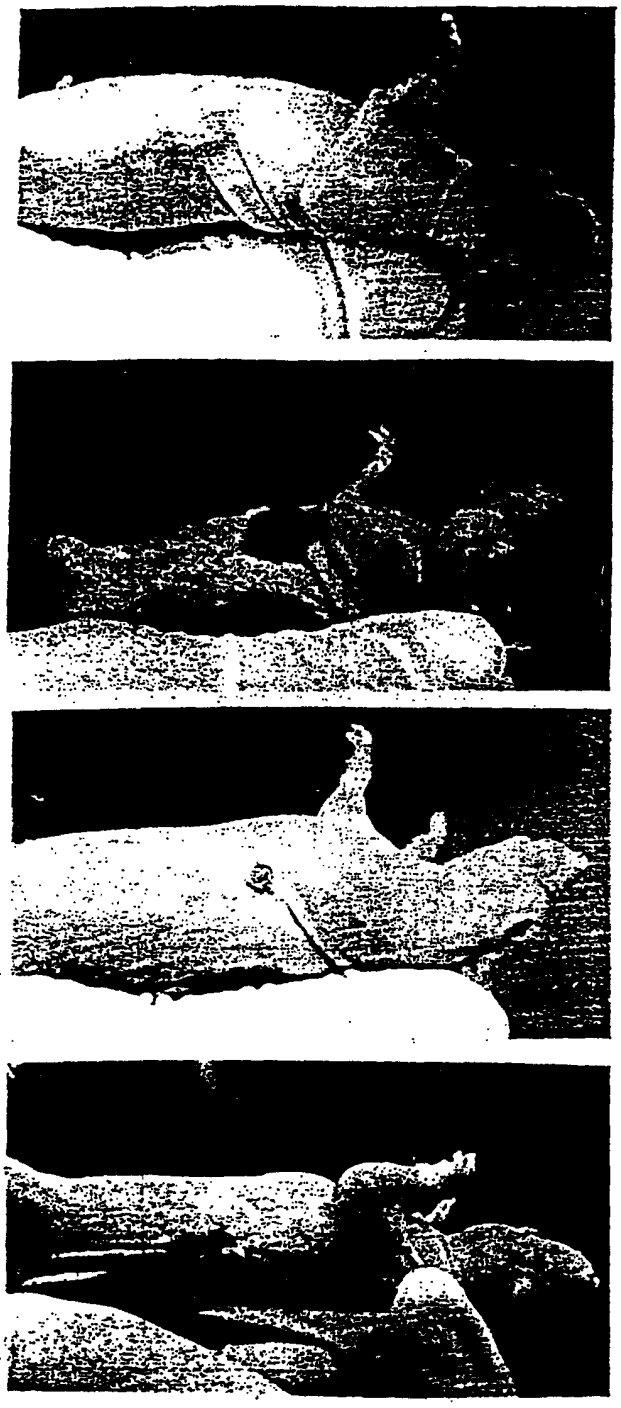

ECT: PANC3, 异体移植 , 裸鼠
肿瘤体积 (mm3)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
1
8
15
18
24
28
35
38
43
50
处理后的天数
D+E-
D+E+

图 10b

用平阳酶素电化疗法治疗后 PANC-3 肿瘤生长情况



对照组 (D+E-)
给药后 29 天

处理组 (D+E+)
处理后9 天

处理组 (D+E)
处理后 29 天

处理组 (D+E+)
处理后 46 天

图 11

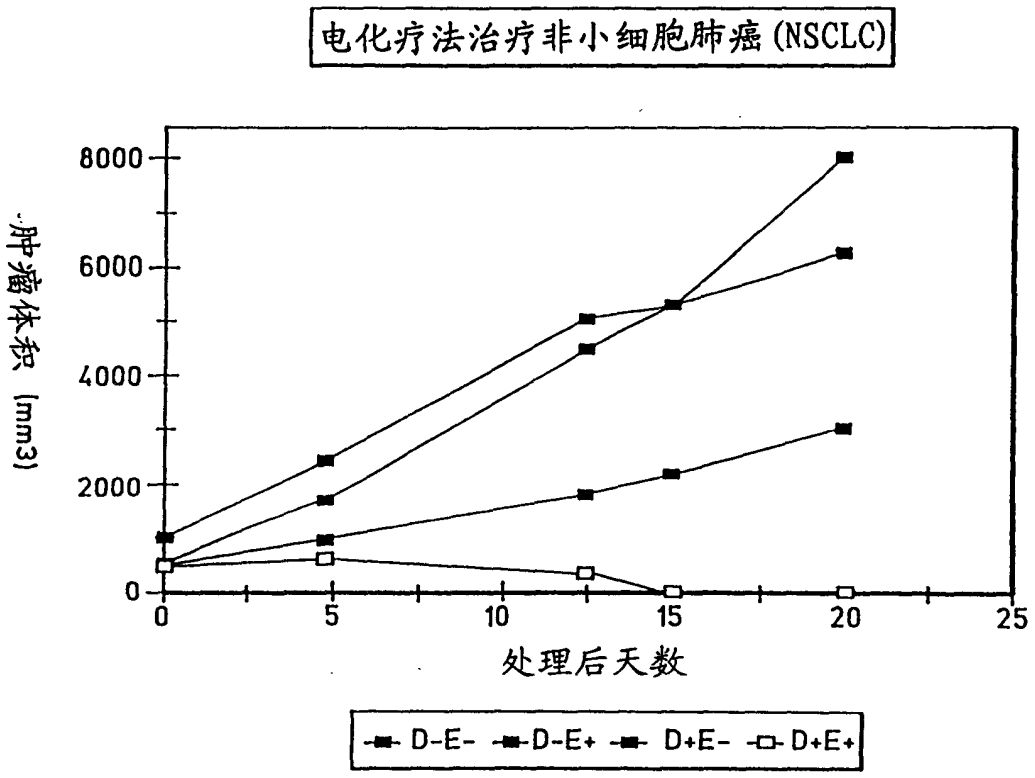

电化疗法治疗非小细胞肺癌(NSCLC)
肿瘤体积 (mm3)
8000
6000
4000
2000
0
0
5
10
15
20
25
处理后天数
D-E-
D-E+
D+E-
D+E+

图 12a

用平阳酶素电化疗法治疗非小细胞肺癌

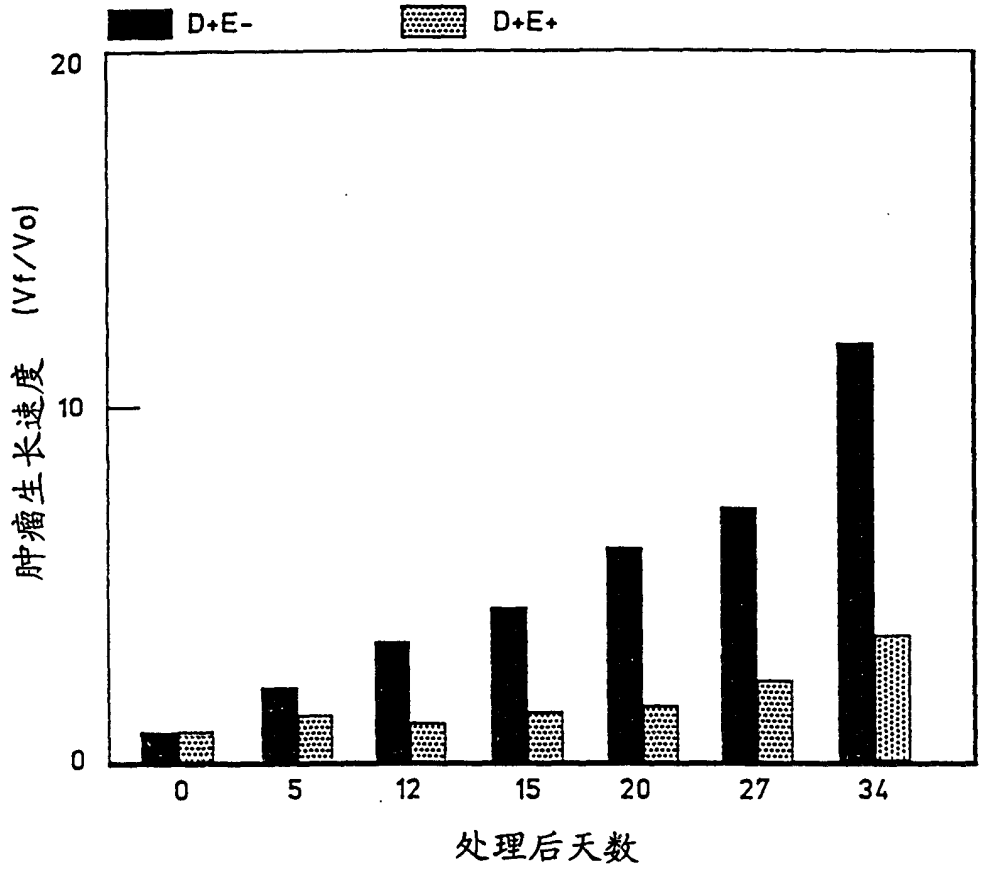


图 12b

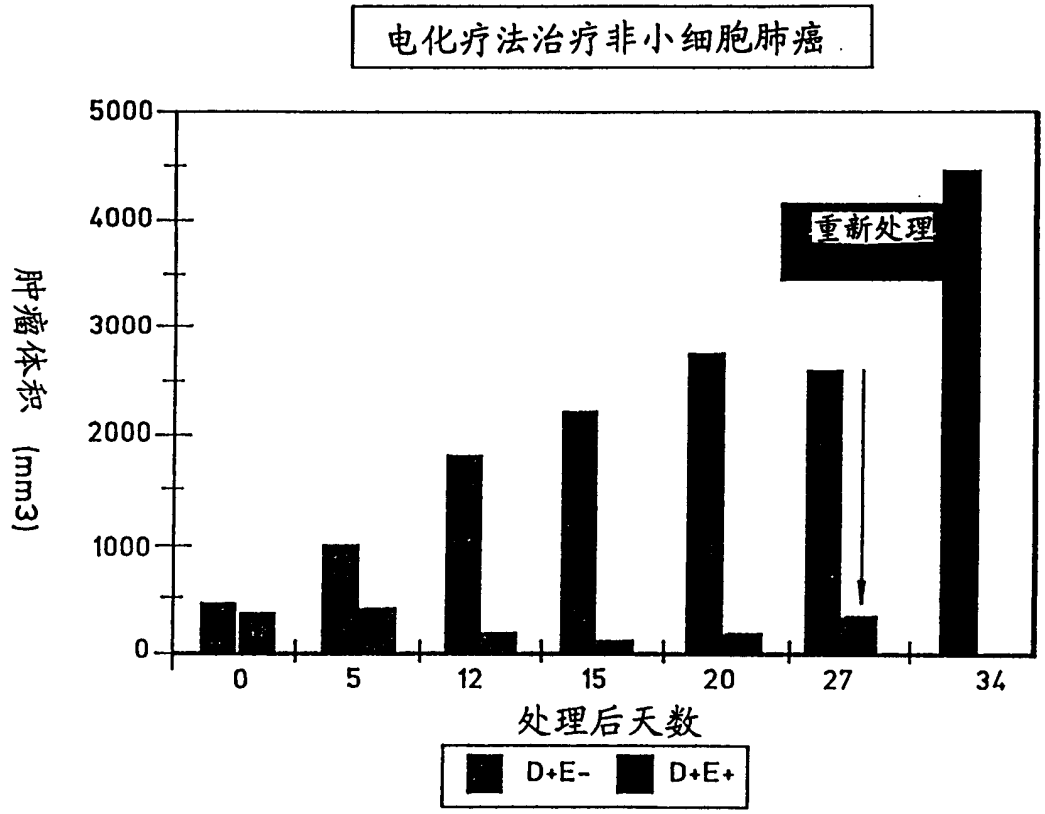

电化疗法治疗非小细胞肺癌
5000
4000
3000
2000
1000
0
肿瘤体积 (mm3)
重新处理
0
5
12
15
20
27
34
处理后天数
D+E-
D+E+

图13

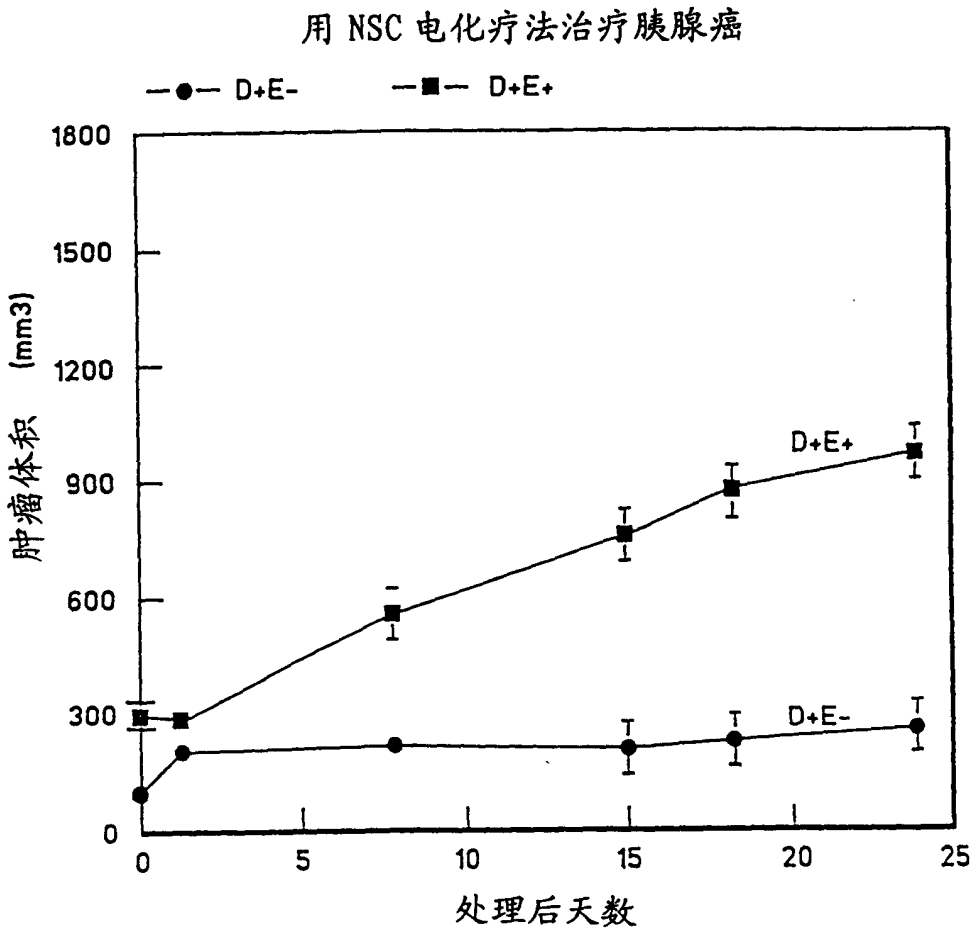

用 NSC 电化疗法治疗胰腺癌
—●— D+E-
—■— D+E+
肿瘤体积 (mm3)
1800
1500
1200
900
600
300
0
0
5
10
15
20
25
处理后天数
D+E+
D+E-

图 14a

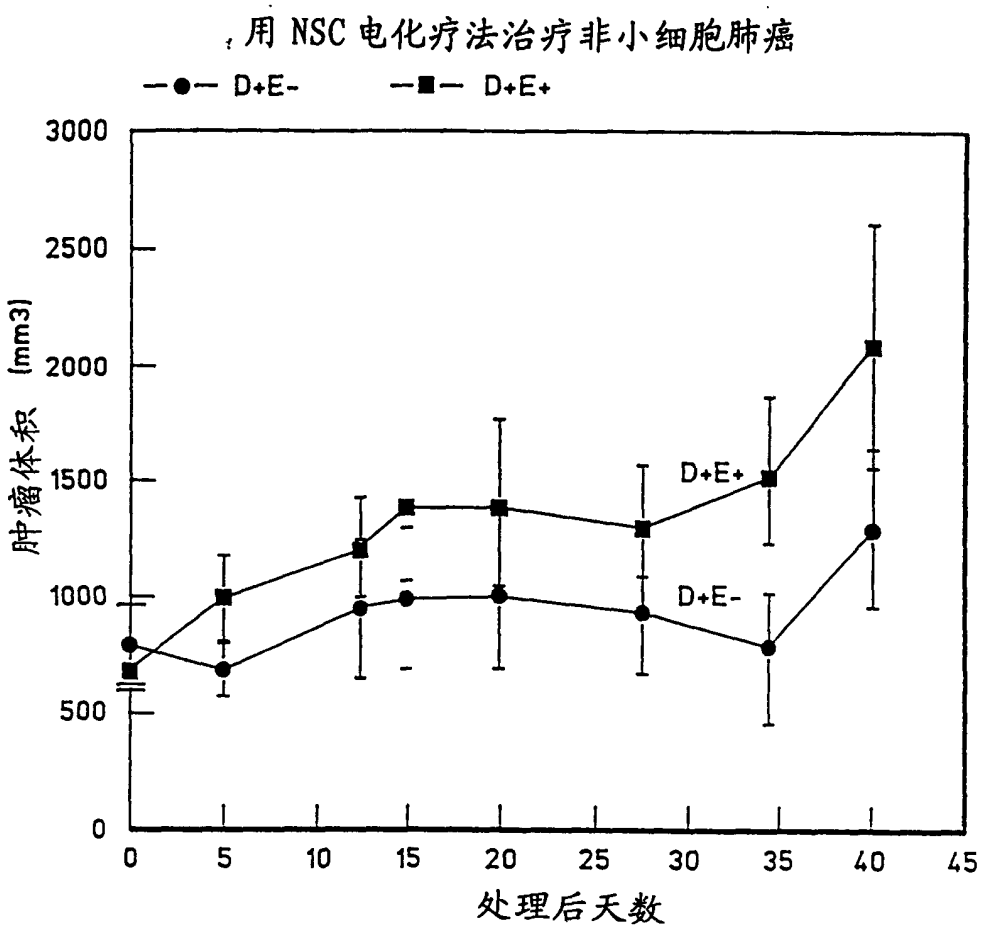

用 NSC 电化疗法治疗非小细胞肺癌
—●— D+E-
—■— D+E+
肿瘤体积 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
D+E+
D+E-
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
处理后天数

图 14b

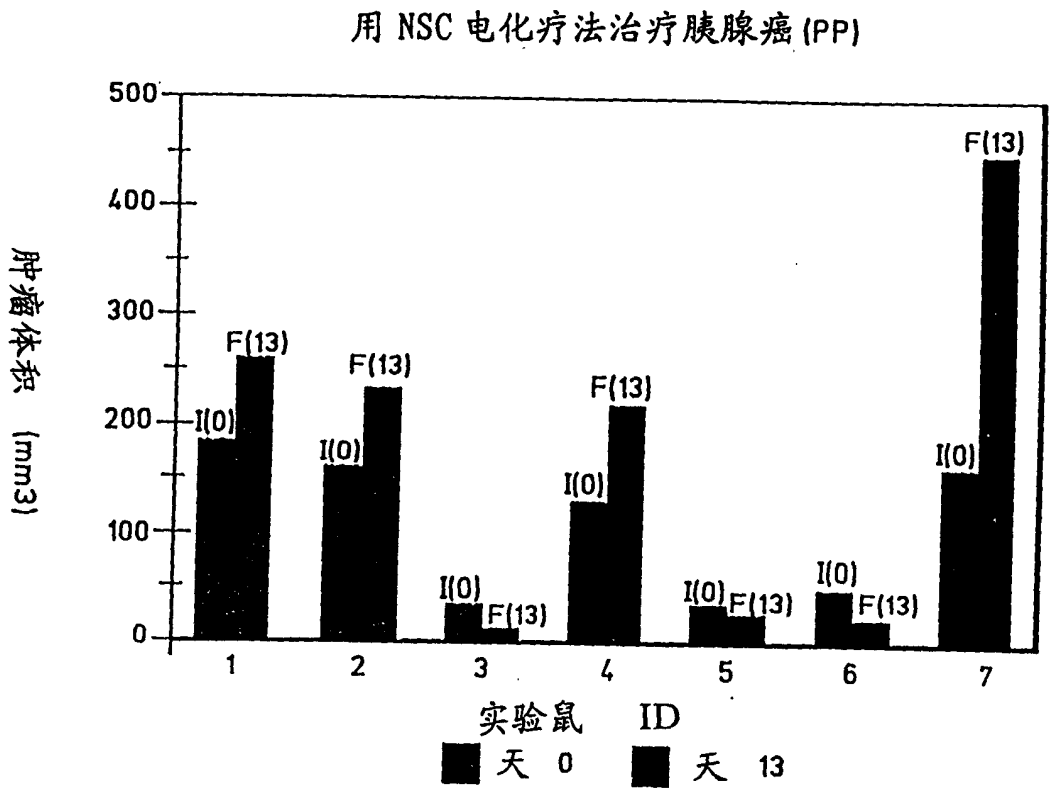

用 NSC 电化疗法治疗胰腺癌(PP)
肿瘤体积 (mm3)
500
400
300
200
100
0
I(0)
F(13)
1
2
3
4
5
6
7
实验鼠 ID
天 0
天 13

图 14c

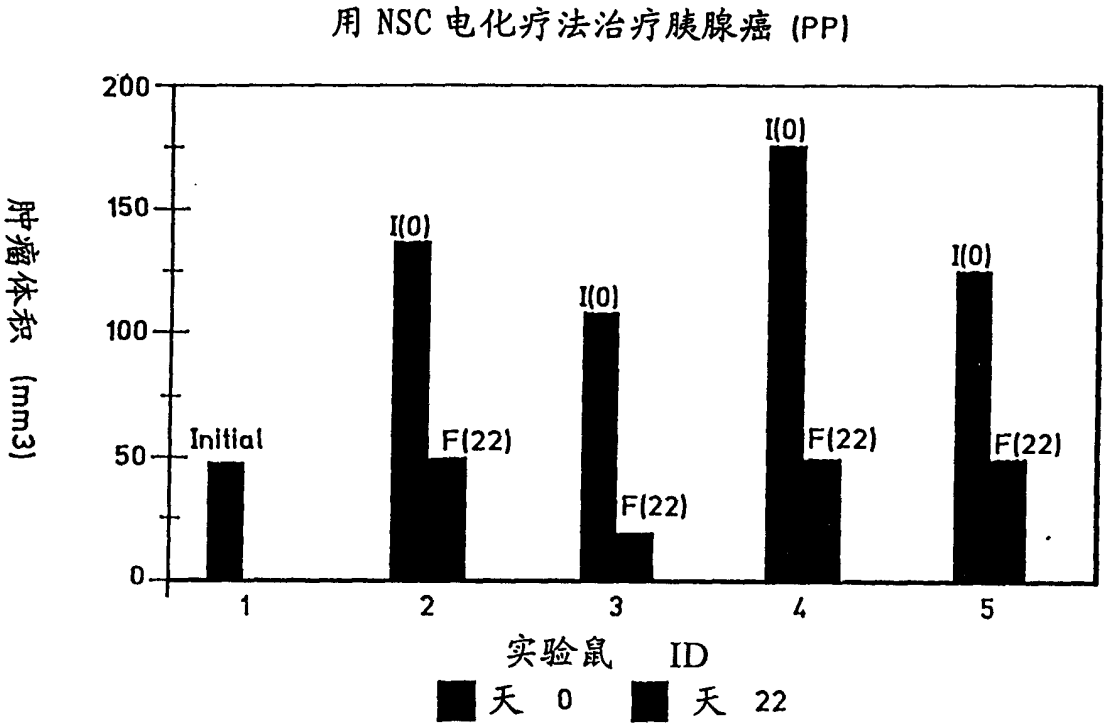

用 NSC 电化疗法治疗胰腺癌 (PP)
肿瘤体积 (mm3)
200
150
100
50
0
Initial
I(0)
F(22)
I(0)
F(22)
I(0)
F(22)
I(0)
F(22)
1
2
3
4
5
实验鼠 ID
天 0
天 22

图 14d